

腺病毒操作手册

☎ 售前tel: 400-092-0065
☎ 售后tel: 400-092-0566



汉恒生物科技（上海）有限公司

📍 地址：上海浦东新区蔡伦路150号1号楼

✉ 邮箱：service@hanbio.net

☎ 电话：021-51296258

☎ 免费热线：400-092-0065

🌐 <http://www.hanbio.net>

扫一扫 关注汉恒生物公众号
咨询更多服务内容

目录

腺病毒安全使用注意事项 /01

腺病毒储存与稀释的注意事项 /01

腺病毒的感染与使用 /02

-腺病毒感染目的细胞 /02

1、腺病毒感染细胞预实验（MOI的摸索） /02

2、腺病毒感染贴壁细胞 /04

3、特殊细胞的感染注意事项 /05

-腺病毒用于动物实验 /05

腺病毒使用的FAQ /06

附：腺病毒滴度测定方法 /10

腺病毒安全使用注意事项

- 01 腺病毒相关实验请在生物安全柜（BL-2级别）内操作。
- 02 操作病毒时请穿实验服，佩戴口罩和手套，尽量不要裸露双手及手臂的皮肤。
操作病毒时需要特别小心病毒溅出。如果操作时超净工作台有病毒污染，请立即用70%乙醇加1%的SDS溶液擦拭干净。接触过病毒的枪头、离心管、培养板及培养瓶请用84消毒液浸泡后统一处理。
- 03 如实验过程中需要离心，应使用密封性好的离心管，必要时请用封口膜封口后离心。
- 04 病毒相关的废弃物需要特殊收集，统一经高温灭菌后处理。
- 05 实验完毕后请用香皂清洗双手。

腺病毒储存与稀释的注意事项

+ 腺病毒的储存

收到病毒液后若在短期内使用，可将病毒放置于 4℃ 保存（一周内使用完最佳）；如需长期保存请分装后放置于 -80℃。

注：a. 在病毒使用过程中尽量避免反复冻融，反复冻融会降低病毒滴度（每次冻融会使病毒滴度降低10%~50%）。汉恒生物对病毒已进行分装（200 μL/tube），收到后请直接放置-80℃冰箱保存即可。

b. 若病毒储存时间超过6个月，汉恒生物建议在使用前重新测定病毒滴度。（滴度测定方法见附录）

+ 腺病毒的稀释

需要稀释病毒时，请将病毒取出置于冰浴融解后，使用PBS或培养目的细胞用的无血清培养基(含血清或含双抗不影响病毒感染)混匀分装后置于4°C保存(一周内使用完最佳)。如原病毒标记的滴度为 1×10^{10} PFU/mL，取10 μ L至90 μ L的常规培养基中，即可得到 1×10^9 PFU/mL滴度的病毒。

腺病毒的感染与使用

+ 腺病毒感染目的细胞

1 腺病毒感染细胞预实验 (MOI的摸索)

MOI (Multiplicity of Infection, 感染复数) 是指每个细胞感染的病毒数，通常MOI越高，目的蛋白的表达量越高，但是毒性也会随之变大。对于分裂活跃的细胞，比如Hela、293细胞，MOI=1~3时，80%以上的细胞均表达目的基因。而对于非分裂细胞，比如原代细胞，感染效率较低。需要进行MOI梯度摸索实验，选择适合的MOI进行实验。

◆ 24孔板摸索MOI :

Day 1: 细胞准备

以293T细胞为例，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至 3×10^5 /mL，加入24孔板，500 μ L/孔(1.5×10^5 个细胞)。放入37°C，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。因细胞的大小和生长速度略有不同，一般是建议保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于30%至50%之间。

Day 2: 病毒感染 (1/2小体积感染法) 及换液

我们推荐1/2小体积感染法，即病毒感染时，加入1/2体积新鲜培养液，加入腺病毒感染4h后补足至培养体积。24孔板感染时的培养体积为250 μ L。

感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒。如需稀释，按原病毒标记的滴度 1×10^{10} PFU/mL计算，取30 μ L至270 μ L的常规培养基中，即可得到 1×10^9 PFU/mL滴度的病毒。

分别取MOI为10, 30, 100, 300, 500进行预实验，摸索最适MOI，以腺病毒滴度 1×10^{10} PFU/mL为例(稀释后滴度为 1×10^9 PFU/mL)，不同的MOI值加入的病毒量见下表：

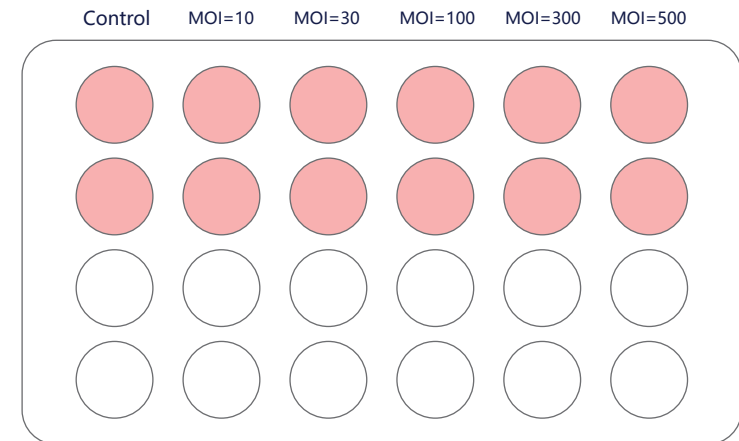


图1 24孔板示意图

注：保持细胞形态清晰、生长良好、无污染，为了减小误差，推荐平行感染2~3个复孔。

表1 24孔板每孔不同MOI值加入病毒液体积

细胞数量	MOI值	稀释后滴度 (PFU/mL)	稀释后病毒液体积 (μ L)
1.5×10^5	10	1×10^9	1.5
1.5×10^5	30	1×10^9	4.5
1.5×10^5	100	1×10^9	15
1.5×10^5	300	1×10^9	45
1.5×10^5	500	1×10^9	75

注：每孔加病毒量 (μ L) = MOI \times 细胞数 / 病毒滴度 (PFU / mL) \times 1000
MOI = (病毒滴度 \times 病毒体积) / 细胞数目

腺病毒加入4h后，补足至500 μ L培养体积。感染后10-16h，吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续37°C培养。

Day 3-4: 观察荧光

感染36-48h显微镜观察荧光。感染效率80%左右，且细胞生长状态良好的组，对应的感染条件和MOI即可作为后续感染实验参考MOI。

注：如果病毒不表达荧光，还可以通过目的基因的qPCR、WB、免疫荧光、免疫组化等方法摸索最佳MOI。

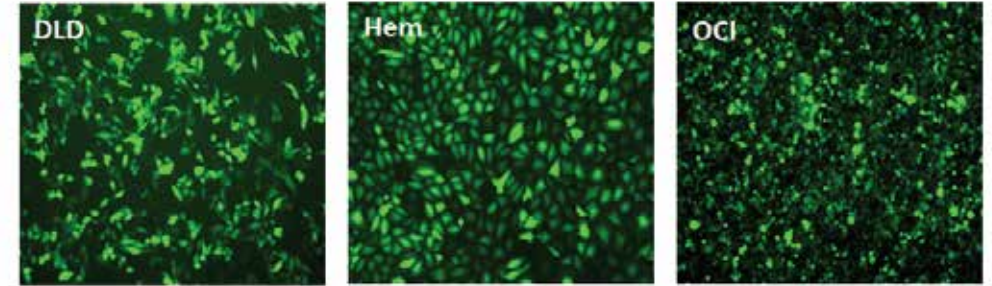


图2 腺病毒感染细胞荧光图

2 腺病毒感染贴壁细胞

Day 1: 细胞准备

以293T细胞为例，将生长状态良好的目的细胞消化计数后稀释至 3×10^5 /mL，加入24孔板，500 μ L/孔(1.5×10^5 个细胞)。放入37°C，5% CO₂ 培养箱中培养过夜。因细胞的大小和生长速度略有不同，一般是建议保证第二天进行病毒感染的时候细胞汇合率介于30%至50%之间。

Day 2: 病毒感染 (1/2小体积感染法) 及换液

我们推荐1/2小体积感染法，即病毒感染时，加入1/2体积新鲜培养液，加入腺病毒感染4h后补足至正常培养体积。具体步骤如下：

感染前，从冰箱取出并在冰上慢慢融化病毒，吸去细胞原有培养基，加入1/2体积新鲜培养基，根据摸索的MOI值，加入合适体积的病毒轻轻混匀，进行感染（每孔加病毒量 (μ L) = MOI \times 细胞数 / 病毒滴度 (PFU / mL) \times 1000)。感染4h后补足至完全培养体积。

表2 不同培养皿加入的培养液体积(腺病毒 1 / 2 培养体积感染法)

培养皿类型	表面积/cm ²	培养基体积	1/2培养体积
96-well	0.3 cm ²	100 μ L	50 μ L
24-well	2 cm ²	500 μ L	250 μ L
12-well	4 cm ²	1 mL	500 μ L
6-well	10 cm ²	2 mL	1 mL

感染后10-16h，吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续37°C培养

Day 3-4: 观察荧光

感染后24-48 h，对于带GFP报告基因的病毒，可通过荧光显微镜观测GFP表达效率。

3 特殊细胞的感染注意事项

1 感染悬浮细胞

感染悬浮或半悬浮细胞，则需要通过平角离心转染法，即将适量的病毒液加入细胞培养皿后，封好口，放入平角离心机后，低速（1200g）离心1 h，然后放入培养箱中正常培养即可。若由于实验条件有限，没有平角离心机，可用离心管代替，将细胞吹打吸入离心管中，进行低速离心，去掉大部分上清，然后加入适量的病毒液，轻轻吹打混匀5-10下，室温放置15 min（尽量不要超过30 min，间隔10min可以再吹打一次），然后将细胞和病毒液同时吸出转入培养皿中继续病毒感染即可。

2 对于极难感染的细胞

对于极难感染的细胞，如DC（树突状细胞）等，可采用多次感染的方法，即感染24 h后，直接二次加入病毒液进行重复感染，可显著提升感染效率。

+ 腺病毒用于动物实验 (必须使用纯化的腺病毒，以小鼠尾静脉注射为例说明)

将纯化过的腺病毒以每只小鼠 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 个病毒颗粒数注射，例如纯化腺病毒的滴度为 1×10^{11} PFU/mL，则每只小鼠所需的病毒原液体积为 50~100 μ L。具体的注射量需要进行实验摸索。

注：a. 小鼠尾静脉注射体积一般固定为100 μ L，最多不要超过200 μ L。注射剂量过多，小鼠容易发生充血性心衰。

获取动物注射视频，关注汉恒生物公众号：菜单栏——微官网——实验视频



图3 实验视频指南

腺病毒使用的FAQ

1 腺病毒如何稀释？

用常规目的细胞培养用的无血清培养基、生理盐水、Hanks液、PBS液等将腺病毒稀释到需要的滴度。如原病毒标记滴度为 1×10^{10} PFU/mL，则取10 μ L病毒液加到90 μ L的培养基中，即可得到 1×10^9 PFU/mL的病毒稀释液。

2 什么是MOI？

MOI，复感染指数，是指病毒对细胞的感染能力，MOI越高，细胞越难被感染。通常把某株细胞有80%被感染时所用的病毒颗粒数和细胞数目的比值作为该株细胞的MOI。

相关计算公式：每孔加病毒量 (μ L) = MOI \times 细胞数 / 病毒滴度 (PFU/mL) \times 1000

MOI = (病毒滴度 \times 病毒体积) / 细胞数目

3 如何确定向细胞中加入腺病毒的最佳时间？

腺病毒感染细胞后需要36-48h观察到腺病毒携带的基因表达，应在细胞汇合度30-50%且细胞状态良好时加入腺病毒。

4 用于腺病毒感染的细胞接种量是多少？

根据细胞大小和增殖的速度调整细胞接种量，以保证在感染后2天左右细胞刚好快长满培养皿底部为宜。

针对大部分细胞系：传代周期在2-3天，感染时细胞铺板的密度保持在30-50%左右，则细胞增殖48h后细胞汇合度约在90%左右；

针对某些原代细胞：由于细胞增长缓慢，可以在接种时提高汇合度到50-60%左右，但要确在感染后2天时细胞汇合度达到90-100%；

针对非分裂细胞：如神经元细胞，接种后不再增殖，此时可以按照100%的汇合度进行接种。

5 腺病毒感染细胞后多久基因表达达到峰值？

腺病毒感染后大部分细胞会在36-48h左右GFP或目的基因表达达到峰值，但是对于生长缓慢的细胞，达到峰值的时间会更长。

6 对照病毒或目的病毒感染细胞以后，细胞形态发生改变或者细胞死亡？

首先，确定病毒是否有污染；

- ① 细菌污染，毒用Millipore 0.22 μ m滤器过滤去除细菌；
- ② 真菌污染，病毒直接丢弃；
- ③ 支原体污染，可使用汉恒抗支原体试剂；
- ④ 细胞碎片，感染后换液几次去除细胞碎片；

其次，确定病毒感染MOI是否过高，调整MOI值，并在感染后的4h、8h对细胞进行观察，若发现细胞状态变差时，则需要使用新鲜的完全培养液替换病毒感染培养液；

排除以上因素后细胞状态仍然不好，尝试增加血清含量，观察细胞状态是否好转。

7 如何提高腺病毒对细胞的感染效率？

腺病毒对细胞的感染效率受多个因素影响，如病毒活性、细胞自身的状态、MOI值、感染时间等。

- ① 病毒活性，解冻病毒一定要在冰上进行，尽量避免反复冻融。-80 $^{\circ}$ C保存半年以上需要重新测滴度；
- ② 目的细胞，先进行预实验测试，看病毒载体是否合适感染目的细胞。对于悬浮细胞，可采用平角离心感染的方法，减少病毒感染时的体积，从而提升感染的效率；
- ③ MOI值，进行MOI梯度摸索实验，找出最优的MOI浓度；
- ④ 感染时间，腺病毒一般在感染后8-16h换液，太早换液会导致感染效率下降；换液太晚，则对细胞的损伤太大。如细胞状态比较好，可适当延长换液时间来进一步提高感染效率。

8 为什么过表达腺病毒比对照的荧光要暗?

每种病毒有自己的载体容量，基因的插入会影响位于其下游的荧光蛋白等基因的表达。

对照病毒或干扰病毒，由于没有插入基因或者插入基因非常短，荧光通常较强。而插入了较长基因之后，荧光的亮度会随着插入基因的长度以及特殊结构的存在等而减弱，尤其是出现高GC片段，由于影响了转录，荧光强度会大大降低。

9 细胞能被腺病毒感染，但为何GFP荧光很弱?

GFP腺病毒感染细胞后，荧光强度取决于病毒进入到细胞的颗粒数、细胞本身的增殖状态、细胞类型、观察时间、GFP前面的启动子活性等因素。

GFP基因荧光表达的强度与启动子的活性、目的细胞感染的病毒颗粒数呈正相关。腺病毒在增殖较快的细胞中感染36-48h后，GFP蛋白表达才达到峰值；在增殖较慢的细胞中，GFP蛋白表达达到峰值需要更久。GFP基因接在强启动子后面时荧光表达较强，弱启动子则荧光表达较弱。

10 要曝光很长时间才能观察到荧光?

可能的原因有：

- ① 显微镜汞灯使用时间长，可以通过对照病毒排除，若对照较亮可排除显微镜问题；
- ② pH值低，看培养基是否发黄，pH值较低会导致绿色荧光淬灭；
- ③ 目的病毒光不亮，插入目的基因后的病毒荧光强度会相对对照弱一些，属于正常现象，可加长曝光时间。

11 在进行基因表达验证时，QPCR有效果，但是WB效果不好?

QPCR有效，WB检测没有过表达的可能原因有：

- ① 检测标签表达，确认标签是否表达，若标签是外源性的，则更容易检测到；
- ② WB直接检测目的蛋白，受到抗体的质量（包括抗体有效性和灵敏度）操作等影响较大。

另外，如果基因翻译受阻，或者出现代偿性上升/下调等都会导致WB检测不到。

12 为什么做WB用flag检测有过表达，用目的蛋白的抗体检测没有过表达?

这种情况存在以下几种可能：

- ① 两种抗体灵敏度不同；
- ② 过表达量被本底表达掩盖，基因在细胞中本身有较高的内源性表达量，过表达之后用目的蛋白抗体WB检测到的条带比本底的浓度只高一点，因此并不明显，如果上样浓度有差异就会被掩盖。而flag抗体是有或无的区别，因此能明显看出差别；
- ③ ORF出现突变或移码，表达的不是目的蛋白。可通过检查测序结果和对照flag抗体做出的条带大小来初步排除。测序结果没有突变，而flag检测到的蛋白和理论大小差不多，证明ORF能正常翻译，出现移码的可能性不大；
- ④ 基因有多个转录本，目的蛋白抗体只能检测到其中某一种或几种表达形式，可以查看一下抗体的抗原表位，

理论上是否能结合。

13 RNA干扰无效果是什么原因？有什么解决办法吗？

1、确认感染效率：

干扰与过表达不同，干扰的效率很大程度上决定于感染效率（假设siRNA的下调效率是80%，但只有50%的细胞感染上，那整体水平上来说，至多只有40%的下调效率）。。

2、确认QPCR数据：

- ① 检查QPCR引物是否有问题，我们设计siRNA的位置主要在CDS区，最好用CDS区的引物来检测，比对一下种属基因是否正确；
- ② 查看溶解曲线峰图，是否平滑，是否有杂峰，是否峰值在80°C以下，如有以上情况可能PCR结果不准确；
- ③ 查看CT值，复孔之间是否均一，干扰对复孔的均一性要求很高，如复孔间误差超过1，计算后就会造成50%左右的下调误差。除复孔均一性外，也要注意CT值大小，有些基因内源性表达极低，CT值接近或超过30，这种低表达的基因再进行下调，本身意义不大，建议更换靶细胞。

14 siRNA下调效果很好，但是包装成shRNA病毒后，下调效果变差?

siRNA和shRNA在结构上是不一样的，siRNA为化学合成，使用浓度一般为5μM，浓度较高，瞬时转染时如细胞转染效率尚可，瞬时进入细胞中的分子数超过10⁸，且不需要经过剪切加工就可和靶点结合，干扰效率高。

shRNA则是将干扰基因克隆到DNA上，经过病毒整合（慢病毒）或非整合（腺病毒，腺相关病毒）进入到细胞后，转录形成发夹RNA，再经过一系列酶的剪切加工，才形成可以和靶点结合的干扰RNA。这个过程中因为拷贝数低（如慢病毒需要整合基因组），转录加工过程复杂，会导致干扰效果不理想。

另外，单从碱基数上来说，siRNA一般为19nt，shRNA一般长度为21nt或25nt，所以有效的siRNA，往往有可能会出现并不合适做成shRNA的情况。

15 腺病毒感染之后多久可以检测?

腺病毒感染细胞一般36-48h可以检测表达，腺病毒做动物实验一般96h可以检测表达。

附：腺病毒滴度测定方法

重组腺病毒TCID50滴度检测

一、前言

本检测须做两组重复实验，两组实验可在同一天进行，也可在不同天进行。

二、材料

- 1、293A 细胞
- 2、DMEM完全培养基，含有5%的FBS
- 3、病毒样品

三、方法

- 1、培养293A 细胞，待细胞生长密度约为80-90 % 时，消化细胞并计数细胞量；
- 2、用含有5% FBS的 DMEM 培养液制备细胞悬液，每板需要11 mL 浓度为 1×10^5 /mL的细胞悬液；
- 3、按每孔100 μ L（即 1×10^4 个细胞）加入2个96孔板；
- 4、制备感染样品。

接种样品：

将96孔板中的11、12两列各加入100 μ L 5% FBS的 DMEM，做阴性对照；
依次加入96孔板中的A-H排，各加100 μ L 标记为8个连续梯度稀释的样品溶液；
盖上第一个板并在37°C CO₂培养箱中培养；
同样步骤操作第二块板；
盖上第二个板并在37°C CO₂培养箱中培养。

实验中培养板的结构如右图：

H	G	F	E	D	C	B	A	
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	1
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	2
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	3
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	4
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	5
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	6
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	7
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	8
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	9
1×10^{13}	1×10^{12}	1×10^{11}	1×10^{10}	1×10^9	1×10^8	1×10^7	1×10^6	10
No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	11
No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	No Virus Control	12

注：样品稀释梯度可随具体情况调整

将96孔板置于37°C CO₂培养箱中培养10天，从第3天到第10天观察细胞状况。

第10天分析、记录CPE结果：

CPE应在10天之内出现。第10天在显微镜下观察每孔CPE情况，并与阴性对照的一排对比，记录每排样品的阳性孔数。

如有一个板被污染，实验必须重做。

病毒活性计算公式：

对于100 μL样品，滴度 $T = 10^{1+d} (s-0.5)$

$d = \log_{10}$ 稀释度 = 1 (对于10倍的稀释度而言)

s = 阳性比率之和 (从第一个10倍稀释度算起)

将TCID50/mL转换成PFU/mL：

$T = a \times 10^b \text{TCID50/mL} = a \times 10^{b-0.7} \text{PFU/mL}$

两次重复实验得到的滴度值应相差 $\leq 10^{0.7}$

以Ad-GFP滴度测定为例：

测定结果为 $1.99 \times 10^{11} \text{PFU/mL}$

稀释度	阳性比率
10 ⁻⁶	10/10=1
10 ⁻⁷	10/10=1
10 ⁻⁸	10/10=1
10 ⁻⁹	10/10=1
10 ⁻¹⁰	10/10=1
10 ⁻¹¹	5/10=0.5
10 ⁻¹²	0/10=0
10 ⁻¹³	0/10=0

滴度：

$$T = 10^{1+(10.5-0.5)} = 10^{11.0} \text{TCID50/100uL}$$

将TCID50/mL换算成PFU/mL

$$T = 10^{11.0-0.7} / 100\text{uL} = 10^{10.3} / 100\text{uL} = 1.99 \times 10^{10} \text{PFU/100uL} = 1.99 \times 10^{11} \text{PFU/mL}$$

四、注意事项

稀释病毒液时要充分混匀。

每次吸病毒液时要更换Tip头，以防导致稀释不准确。